

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：37601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K02327

研究課題名（和文）機能性増強を目指したきのこ栽培法を短期間で開発するための評価法の開発

研究課題名（英文）Development of evaluation method to develop mushroom cultivation method aiming at functional enhancement in a short time.

研究代表者

吉本 博明（Yoshimoto, Hiroaki）

南九州大学・健康栄養学部・教授

研究者番号：30516919

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：きのこは健康効果を持ち多くの人の健康に寄与している。きのこの健康効果は、栽培方法の改編で増強することが可能であるが、実際には多くのコストと時間を必要とする。本研究では、きのこの健康効果を増強する栽培法を開発するための、簡便な指標の探索をおこなった。そのターゲットとして、きのこの多彩な薬理作用が抗炎症作用に起因するとの仮説の下に、抗炎症作用の上流に位置するNF-κB阻害活性をターゲットにした。NF-κB阻害活性とさまざまな機能性との相関を検討した結果、きのこの抗炎症作用を説明する指標としてNF-κB阻害活性が有効であることが示唆された。今後、詳細な条件を検討することで社会実装可能になると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会を迎えた日本にとって、健康寿命の延伸は重要な課題である。医療の進歩は著しいが、一方で国民経済を圧迫しているのも事実である。きのこは古来漢方薬にも利用され国民に親しまれているとともに、その多彩な薬理作用は、医薬品にも比肩する高い効果が証明されている。したがって、食事に多くのきのこを取り入れることは国民経済的にも意義深い。一方で機能性が低い栽培法も存在し、機能性を考慮した栽培法の開発も不可欠である。本研究は、きのこ栽培を機能性の観点から改変するための指標を探索するという点で独創的であり、かつ社会的に意義の高い研究であると言える。

研究成果の概要（英文）：Mushrooms contribute to human health. The health benefits of mushrooms can be enhanced by reorganizing cultivation methods, but they actually require a lot of cost and time. In this study, we searched for a simple index to develop a cultivation method that enhances the pharmacological effect of mushrooms. We targeted NF-κB inhibitory activity, which is located upstream of the anti-inflammatory mechanism, under the hypothesis that the various pharmacological effects of mushrooms are due to their anti-inflammatory effects. As a result of examining the correlation between the NF-κB inhibitory activity and various functions, it was suggested that the NF-κB inhibitory activity is effective as an index explaining the anti-inflammatory effect of mushrooms. In the future, we think that it will be possible to implement it in society by examining detailed conditions.

研究分野：きのこ学

キーワード：きのこ 機能性 栽培法 NF-kappa B ヒラタケ ヒメマツタケ

### 1. 研究開始当初の背景

きのこは健康志向の高まりの中「ヘルシーフード」として知られている。そのような背景から、きのこの健康効果に関する研究は長くおこなわれている。当初、医薬品原料として研究され、カワラタケ由来のクレスチン、シイタケ由来のレンチナンなどの抗がん剤が開発、発売された。近年では創薬原料としてではなく、食材としてとらえた機能性研究が盛んになっている。

一方、きのこは栽培する品種(株)や培地によって健康効果が異なることが明らかになり、培地にカルシウムを添加してカルシウムリッチなきのこを栽培する方法や機能性アミノ酸のGABA リッチなきのこの栽培法なども開発されている。近年では、特定成分の増強よりも健康効果の増強を目指した栽培法の改変も試みられている。

しかし、例えば、抗炎症作用などの健康効果を標的とした栽培技術の改変では、きのこの健康効果が多成分系、すなわち、カクテルのように無数の成分の複合体によって発現されていることから、特定の成分量の多寡で評価することは非常に難しい。したがって、任意の疾患モデル動物や培養細胞などを用いて「健康効果の現象を捕まえる」迂遠な方法で解析をしなければならない。

### 2. 研究の目的

これまできのこの多様な健康効果を証明し、解析するためには図1左に示すように、各種疾患に応じた実験系で丹念に精査することが必要であった。中でも疾患モデル動物を使用した試験が主流で、これはコスト面、ならびに研究期間の面で多大な労力と時間を要してきた。現在でも創薬を目的とする研究においては、この研究戦略は必須だが、きのこ栽培法の改変においては、ここまで多大なコストをかけることは現実的ではない。

図の右に本研究で目指す戦略を示した。本研究では、各種疾患の基盤ともいえる炎症反応に着目し、炎症反応における体内動態のモデルともいえる、血小板凝集作用、および、炎症性サイトカイン遺伝子発現のカスケードにおける両者をつなぐ上流域で作用していると考えられる作用を検索し、本作用点の解析結果によって、きのこの多様な健康効果のメルクマールとなる挙動を推定する。これが可能になれば、きのこの健康効果を重視した栽培法の改善が飛躍的に早くなり、キノコ栽培のイノベーションが可能になると思われる。

本研究が完遂すれば、きのこの健康効果に特化した栽培技術の飛躍的な向上が見込まれ、現在停滞している日本のきのこ産業にとって有益な技術の確立につながる事が予想される。日本のきのこ生産技術は、世界的にみて最先端の技術を持っていたが、近年、アジア諸国などからキャッチアップされつつある。本研究で日本のきのこ産業にイノベーションを起こし、輸出を視野に入れた農林水産業の確立に寄与すると考える。

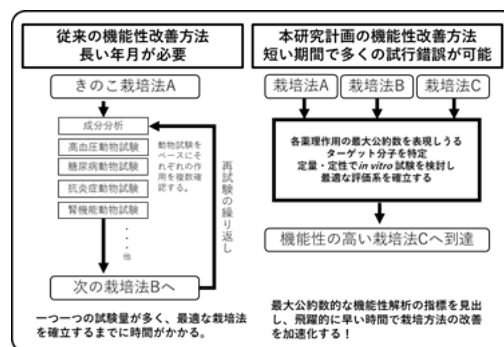


図1 栽培法による健康効果改善方法(左:従来法、右:本研究)

### 3. 研究の方法

#### (1) 供試材料となるモデルきのこの栽培

評価にあたって、供試材料となる培地材料を改変したきのこ栽培をおこなった。ヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) に濃度の異なるクロレラ抽出残渣を添加し子実体を得た。ヒメマツタケ (*Agaricus subrufescens*) を赤色LED下、青LED下、暗黒下で培養し培養菌糸体を得た。ヒメマツタケをサトウキビ茎葉、トウモロコシ茎葉、木粉で栽培し子実体を得た。これらの乾燥物を冷水(4℃)、熱水(80℃)、30%および70%エタノールで抽出し凍結乾燥サンプルを得た。

#### (2) 各種サンプルの機能性評価

各サンプルは、DPPHラジカル消去活性、血小板凝集抑制活性、IL-8遺伝子発現抑制活性を計測した。健康効果のメルクマールとなる評価としては、抗炎症作用など幅広い疾患において関与することが判明しているNF-kBをターゲットとした。

NF-kBの活性評価は、 $5 \times 10^5$ /mL正常成人ヒト繊維芽細胞(Promo Cell, Heidelberg, Germany)を50  $\mu$ L/well、96 wellマイクロプレートに播種し、24時間培養後、100  $\mu$ g/mLヒメマツタケ抽出物を50  $\mu$ L添加し18時間培養した。1  $\mu$ g/mL LPS 50  $\mu$ Lで細胞を2時間刺激し、NFkB p65 (Total/Phospho) InstantOne ELISA™ Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)で450 nmの吸光度を測定した。

#### (3) 各種サンプルの相関係数の解析

過去のデータからのべ76種のきのこの抽出物の各種アッセイ間の相関を検討した。抗酸化活性(DPPH radical assay)、血小板凝集抑制活性(3種)、IL-8遺伝子発現抑制活性、 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害活性、ACE阻害活性の15通りの組み合わせの相関を見た。

### 4. 研究成果

(1) きのこ種の違いによる各種薬効の相関

過去のデータからのべ76種のきのこの抽出物の各種アッセイ間の相関を解析した。抗酸化活性 (DPPH radical assay)、血小板凝集抑制活性 (3種)、IL-8 遺伝子発現抑制活性、 $\alpha$  グルコシダーゼ阻害活性、ACE 阻害活性の15通りの組み合わせの相関を見たところ、 $R^2=0.63\sim 0.96$  (20種サンプル)、 $R^2=0.57\sim 0.92$  (56種サンプル) で、いずれも強い相関を示したことから、これらの薬理活性は、相互の活性の強さを説明しうると結論した。

(2) 光環境による NF-kB p65 活性の差異

本研究で作出したサンプルについて、栄養剤としてクロレラ抽出残渣を添加したヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) 熱水抽出物の NF-kB 活性は、添加濃度による用量依存性が確認できなかったが、光条件を変えたサンプルにおいて、赤色 LED 光下で栽培したサンプルにおいて用量依存的傾向が認められた。ヒメマツタケ (*Agaricus subrufescens*) においては、赤色 LED 光下で培養したサンプルにおいて、NF-kB p65 Total の活性が有意に低い結果となった。このことから、赤色 LED の波長 660 nm はきのこの炎症抑制作用を増強する可能性が示唆された。

(3) 抽出方法による NF-kB p65 活性の差異

ヒメマツタケ (*Agaricus subrufescens*) CJ-01 株をトウモロコシ茎葉堆肥 (CC)、サトウキビ茎葉堆肥 (SC)、木粉培地 (SD) で栽培した子実体を、4°C 冷水、80°C 熱水、30%エタノール、70%エタノールで抽出物の NF-kB p65 活性を比較したところ、4°C 冷水抽出物において有意な差が認められた (図2)。

(4) NF-kB p65 活性とその他の薬理活性との相関

本研究で作出した同菌株内の異なる栽培条件から得られた子実体抽出物の NF-kB p65 の阻害活性とその他の薬理活性との相関を見たところ、 $R^2=0.422$  と弱い相関を検出するのみであった。これは、NF-kB の検出結果が 0.24~1.37 と狭く検出感度が狭いことによると考える。したがって、分解能の高い広いレンジでの検出条件を精査する必要があると結論した。

今後は、NF-kB p65 の阻害活性の分解能を高めるための諸条件、すなわち、用いる細胞種の検討、NF-kB 惹起剤を検討する。

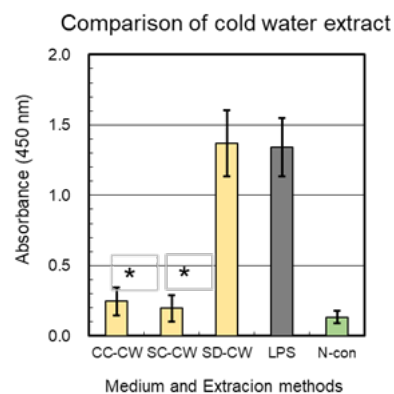


図2 冷水抽出物の NF-kB 活性比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉本博明、森 日向、森園由香、 宮澤紀子、江口文陽
2. 発表標題 機能性を増強するきのこ栽培のスクリーニング法の検討
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉本博明、森園由香、宮澤紀子、江口文陽
2. 発表標題 LED照射によるヒメマツタケ機能性の増強-NF-kBと各種機能性の相関-
3. 学会等名 第71回日本木材学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉本博明、森園由香、新田 剛、徳永冠哉、宮澤紀子、江口文陽
2. 発表標題 クロレラ抽出残渣を添加したヒラタケの機能性解析
3. 学会等名 第70回日本木材学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉本博明、森園由香、宮澤紀子、江口文陽
2. 発表標題 LED照射によるヒメマツタケ機能性の増強
3. 学会等名 第70回日本木材学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	江口 文陽 (Eguchi Fumio)  (60337467)	東京農業大学・地域環境科学部 森林総合科学科・教授  (32658)	
研究協力者	森園 由香 (Morizono Yuka)  (80803379)	第一工科大学・共通教育センター・助教  (37702)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------